

Partial Translation of Japanese Laid-Open Patent Publication No. 5-64594

Date of Laid-Open: March 19, 1993

Application No. 3-248388

Filing date: September 3, 1991

Applicant: Takara Shuzo Co., Ltd.

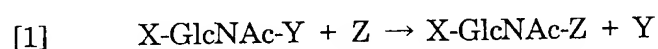
Inventors: Kaoru Takegawa et al.

Title of the Invention:

A method for producing a saccharide or a glycoconjugate

Claim:

1. A method for producing a saccharide or a glycoconjugate comprising carrying out a transfer reaction represented by the following formula (1) in the presence of an endoglycosidase:



wherein X represents a saccharide, GlcNAc represents N-acetylglucosamine, Y represents a saccharide or a glycoconjugate, and Z represents a saccharide or a glycoconjugate.

[0009] to [0011]

[0009] The endoglycosidase used in the present invention includes endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase (hereinafter, the enzyme is abbreviated as endo A), which is produced by *Arthrobacter protophormiae* AKU 0647 reported by K. Takegawa et al. [Appl. Environ. Microbiol., Vol. 55, pp.3107-3112 (1989)]. It is described that, for example, the enzyme specifically degrades the site indicated by an arrow in oligomannose type sugar chain represented by the following formula (2):

[0010]

[2]

↓

(Man)<sub>6</sub>GlcNAc - GlcNAc - Asn - (peptide).

[0011] However, it has not been known that the enzyme retains the activity to carry out a transfer reaction of a sugar chain. As described above, although a transfer reaction of a sugar chain by endo F or endo- $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase derived from *Diplococcus* has been reported, the present inventors have firstly found a transfer reaction of a sugar chain to a saccharide, a sugar chain, a glycopeptide, or a glycoprotein.

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-64594

(43)公開日 平成5年(1993)3月19日

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>

C12P 19/26

識別記号

庁内整理番号

7432-4B

FI

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数1(全 6 頁)

(21)出願番号 特願平3-248388

(22)出願日 平成3年(1991)9月3日

(71)出願人 591038141

寶酒造株式会社

京都府京都市伏見区竹中町609番地

(72)発明者 竹川 薫

香川県木田郡牟礼町大字牟礼字岡1374の4

牟礼第2住宅1-404号

(72)発明者 近藤 昭宏

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造

株式会社中央研究所内

(72)発明者 加藤 郁之進

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造

株式会社中央研究所内

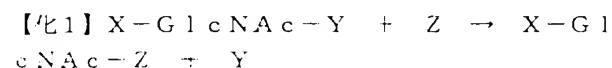
(74)代理人 弁理士 中本 宏 (外2名)

(54)【発明の名称】 糖質又は複合糖質の製造方法

(57)【要約】

【目的】 糖鎖のリモデリング反応を利用した簡便な糖質又は複合糖質の製造方法を提供する。

【構成】 エンドグリコシダーゼの存在下、下記式(化1)：



(式中Xは糖質、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン、Yは糖質又は複合糖質、Zは糖質又は複合糖質を示す)で表される転移反応を行う糖質又は複合糖質の製造方法。

【効果】 副生物の生成も少なく、目的の糖質を効率良く容易に製造でき、分離精製も容易である。生理活性物質の機能増強に有用である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 エンドグリコシダーゼの存在下、下記式



(式中Xは糖質、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン、Yは糖質又は複合糖質、Zは糖質又は複合糖質を示す)で表される転移反応を行うことを特徴とする糖質又は複合糖質の製造方法。

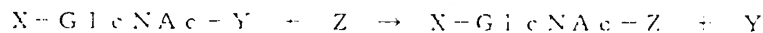
## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は酵素の糖質転移能を利用した、リモデリングした糖質又は複合糖質の製造方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】糖質及び複合糖質(糖タンパク質、糖脂質、グルコサミノグリカン等)は、生物の細胞、体液、果実、種や、微生物の細胞又はその培養液中に存在しており、重要な生物活性を有していることが知られている。最近その生物活性を医薬品として利用しようという試みが、遺伝子組換え技術の発展と共に盛んに行われるようになってきた。例えば、インターフェロン、エリスロポエチン、ティシュプラスミノゲンアクチバターなどがそれであり、培養動物細胞で生産され、薬剤として使用されている。しかし、これらの複合糖質は、投与後体内での代謝速度が早く、大量投与が必要であり、その副作用も問題にされている。複合糖質中の糖鎖が体内での代謝(例えば、レセプターへの結合、プロテアーゼによる分解等)の速度に深く関与しており、その糖鎖の構造を変えることにより、複合糖質の機能増強(代謝速度や活性の調節等)に役立つと考えられている。現在広く用いられている糖鎖のリモデリングの手法は、D. H. ジョジアッセ(D. H. Jozeasse)ら【ヨーロッパジャーナル オブ バイオケミストリー(Eur. J. Biochem.)、第191巻、第75～83頁(1990)】に記載しているように、エキソグリコシダーゼ又はグリコシルトランスフェラーゼを用いたものであり、糖鎖の非還元末端からの逐次変換である。また、エンドグリコシダーゼを用いた糖転移反応の報告は、R. B. トリムフル(R. B. Trimble)ら【ジャーナル オブ



【0006】(式中Xは糖質、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン、Yは糖質又は複合糖質、Zは糖質又は複合糖質を示す)で表される転移反応を行うことを特徴とする。

【0007】本発明者らは、1段階の反応で糖鎖の転移反応を行えることが期待できるエンドグリコシダーゼを用いて、糖質及び複合糖質に糖鎖を転移させ、従来の安定性及び活性が増強された新規糖質及び複合糖質の製造を試み、鋭意研究したところ、この目的にかなうエンドグリコシダーゼを見出し、その反応方法を更に研究した結果本発明を完成した。

(化1)：

## 【化1】

バイオロジカル ケミストリー(J. Biol. Chem.)、第261巻、第12000～12005頁(1986)】のフラボバクテリウム・メニンゴセプチカム(Flavobacterium meningosepticum)由来のエンド-Dに関するものと、R. M. バードール(R. M. Bardales)ら【ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー、第264巻、第19893～19897頁(1989)】のディプロコッカス・ニューモニエ(Diplococcus pneumoniae)由来のエント-α-N-アセチルガラクトサミニダーゼに関するものである。前者はクリセロールがアクセプターとなるという報告であり、後者は、グリセロール、トリス、p-ニトロフェノール、セリン、スレオニンがアクセプターとなるという報告である。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】前述のように、糖鎖をリモデリングした複合糖質の安定性や生物活性が天然の複合糖質に比して増強されれば、医薬品に応用した場合非常に有用である。しかし、従来のエキソグリコシダーゼ又はグリコシルトランスフェラーゼを用いたリモデリングの手法では糖残基1つ1つについて、酵素反応を行わなければならない、反応ステップが多くなり大変煩雑である。また、前述のエンドグリコシダーゼを用いた糖転移反応の場合も、糖質や複合糖質がアクセプターとなるのではなく、これまでに糖質や複合糖質が直接アクセプターとなる糖鎖のリモデリングの機構は見出されていない。本発明の目的は、糖質や複合糖質が直接アクセプターとなる糖鎖のリモデリング反応を見出し、該反応を利用した簡便な糖質又は複合糖質の製造方法を提供することにある。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】本発明を概説すれば、本発明は糖質又は複合糖質の製造方法に関し、エンドグリコシダーゼの存在下、下記式(化1)：

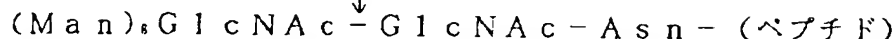
## 【0005】

## 【化1】

【0008】本発明は、糖鎖の転移反応能を持つエンドグリコシダーゼを用いて、糖質及び複合糖質の糖鎖をリモデリングすることを特徴とする新規糖質及び複合糖質の製造方法である。

【0009】本発明におけるエンドグリコシダーゼとしては、例えばK. タケガワ(K. Takagawa)ら【アプライド・バイオ・エシロジカメタル・バイオテクノロジー(Appl. Environ. Microbiol.)、第55巻、第3107～3112頁(1989)】によって報告されている、アラバコバクテリウム・プロトホルムエ(Arthrobacter protophormiae)AKU-0647によって生産される

エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ（以下、本酵素をエンドAと称す）があり、該酵素は例えば下記式（化2）のオリゴマンノース型の糖鎖の矢印の部分で



【0011】しかしこの酵素が糖鎖の転移反応を行う活性を併存していることは知られていない。確かに前述のごとくエンドAやチロプロコッカス由来のエンド-α-N-アセチルガラクトサミニダーゼの糖鎖転移反応の報告はあるが、糖又は糖鎖又は糖ペプチド又は糖タンパク質への糖鎖転移反応は、本発明者らが始めて見出したものである。

【0012】前述の本発明の転移反応において、Xは糖質を示し、酵素としてエンドAを用いる場合、Xとしてはマンノース、グルコース等より構成されるホモオリゴマー、マンノース、グリコース、N-アセチルグルコサミン等の2成分以上より成るヘテロオリゴマーによく作用する。

【0013】Yは糖質又は複合糖質であり、本発明のエンドAを用いる場合、グリコース、マンノース、N-アセチルグルコサミン等の単糖、これらの2単糖以上のホモオリゴマー、これらの2成分以上より成るヘテロオリゴマー等の糖質によく作用し、またその末端にAsnや、Asnを介しポリペプチドが結合した複合糖質、その末端にThr又はSerや、Thr又はSerを介しポリペプチドが結合した複合糖質等でもよい。

【0014】また、エンドAを用いた転移反応のアクセプターのZとしては、その非還元末端にC-4位が遊離の糖を有する糖質又は複合糖質をアクセプターとする場合よく反応する。該アクセプターのC-4位が遊離の糖の中でもそのC-4位及びC-6位がグルコースと同じ立体配座をもつものが特に、アルコース、グルコサミン、N-アセチルグルコサミン、マンノース、マンノサミン、N-アセチルマンノサミン、アロース等の単糖、又はこれらの糖を非還元末端とする糖質、又は複合糖質によく作用する。またこれらの糖質のα-及びβ-メチルアグリコシド、又はα-及びβ-p-ニトロフェニルグリコシド、アルコース-1-オリド、酸、マンノース-1-リン酸等の糖質にも作用する。

【0015】本発明の転移反応は、通常、原料の糖質又は複合糖質、エンドグリコシターゼ、及び緩衝液を含む出発溶液に、アクセプターの糖質又は複合糖質を加えて行われる。糖質及びアクセプターの使用量は特に制限されず、その飽和量まで使用できるが、アクセプターが過剰に存在すれば好ましくない。エンドグリコシターゼの使用量は特に制限されず広い範囲から適宜選択できるが、通常は1mM以上、通常1mM以上、より好ましくは1.0mM〜1.0M程度使用すれば良い。緩衝液としてはpH4.5〜11程度で好適な緩衝液を用いれば良い。通常はpH8付近で緩衝液中で反応を行う。

より分解するという基質特異性が述べられている。

【0016】

【化2】

【0016】本発明の転移反応は、出発溶液に有機溶媒、無機塩等を加えて疎水性状態としてもよく反応し、有機溶媒として、例えばメタノールを用いれば、水難溶性の糖質又は複合糖質を使用することかできる。エンドAの場合、40%メタノールの存在下でもよく反応し、50%メタノールの存在下でも約80%の相対活性を示す。また、DMSO（ジメチルスルホキシド）やDMF（N,N-ジメチルホルムアミド）なども用いることができる。

【0017】本発明の転移反応は、エンドAを用いる場合、通常室温〜60℃程度、好ましくは30〜40℃程度の温度下及びpH5〜11程度のpH条件下に行われ、その反応条件にもよるが、転移反応は通常5分〜30分程度、好ましくは10〜20分程度で終了する。

【0018】生成するリモデリングした糖質又は複合糖質は、公知の手段に従って反応終了液から容易に分離・精製することができる。例えば、ゲル過カラムクロマトグラフィー、イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィー等により反応終了液から、リモデリングした糖質又は複合糖質を分離し、更に濃縮、脱塩、凍結乾燥等を行えばよい。

【0019】また、本発明の方法で製造した糖質又は複合糖質は各種糖質分解酵素の基質ともなり、各種有用酵素の検索にも用いることができる。例えば、エンドAの存在下、(Man)<sub>6</sub>(GlcNAc)<sub>2</sub>Asnにα-p-ニトロフェニルグルコース（p-NP-α-Glc）を作用させ、得られる(Man)<sub>6</sub>(GlcNAc)<sub>1</sub>(Glc)<sub>1</sub>-α-PNPは試料中のエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼの検出及び測定に用いることができる。すなわち試料中の目的の酵素が存在すればp-NP-α-Glcが遊離し、次にα-グリコシターゼを作用させれば遊離のp-ニトロフェノールが黄色を示し、ラジオアイソトープや蛍光計などを必要とせず、試料中の酵素活性を測定することができる。試料としては例えば、微生物の培養液、培養液からの精製物、動物、植物等からの調製物等を用いることができる。またp-NP-α-Glcの替りに例えば、X-Glc（5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-D-グルコシド）を用いることができ、この場合は最終的には青色の発色が示される。

【0020】また、例えば本発明でPNP化糖質を還元し、p-アミノフェニル糖質を調製し、次に、例えば活性化アザロ糖やアザロ糖や臭化アザロ糖等に結合させることにより、糖質が結合した担体を容易に調製することかできる。この糖質結合担体は各種

レクチンの精製や、グリコシダーゼ、グリコシルトランスフェラーゼのアミノ酸担体として有用である。また、例えば本発明のメチルグリコシド化糖質を用いても、該糖質はエポキシ活性化アガロース等に容易に固定化することができ、調製した糖質結合担体は上記と同様の目的で使用する事ができる。

#### 【0021】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 【0022】実施例1 $\text{GlcNAc}$ への糖鎖の転移反応

(1) 前出、アブライド・アランド・エン・ハイロメンタル・マイクロバイオロジーに記載の方法に従って、アルスコバクター・プロトホルミエ AKU 0647を培養し、エンドAを調製し、以下実施例に使用した。該菌株は、工業技術院微生物工業技術研究所に微生物寄第12430号 (FERM P-12430) として寄託されている。1、3Mの $\text{GlcNAc}$  (和光純薬社製) の水溶液 $100\mu\text{l}$ に、1M酢酸緩衝液 (pH6.0) を $20\mu\text{l}$ と、エンドAを $10\text{mU}$ 含む酵素溶液 $50\mu\text{l}$ を加え、 $37^\circ\text{C}$ にて10分間予備インキュベーションした。次いで $(\text{Man})_6(\text{GlcNAc})_2\text{-Asn}$  (バイオカプケミカル社製) ( $13\text{mg/ml}$ ) を $100\mu\text{l}$ 添加し、 $37^\circ\text{C}$ で20分間反応させた後、 $100^\circ\text{C}$ にて3分間加熱処理し、反応を止めた。反応液を凍結乾燥後、特開平1-10177号公報に記載の方法に準じ2-ピリジルアミノ化 (以下PA化と略記する) を行い、HPLCにて精製し、PA化された転移生成物である $(\text{Man})_6(\text{GlcNAc})_2\text{-PA}$ を得た。次にこのPA化物の組成分析、NMR及びMS分析を行い、その糖鎖構造を確認した。

(2) 上記と同様の条件で転移反応を行い、反応開始後、5分、10分、20分、30分、及び60分後にサンプルを取り出し、上記と同様にPA化生成物を調製し、その収率を求めた。図1は反応時間 (分、横軸) と収率 (%)、縦軸) との関係を示す図であり、20分後で約50%の収率を示した。

#### 【0023】実施例2 $(\text{GlcNAc})_2$ への糖鎖の転移反応

1、3Mの $(\text{GlcNAc})_2$  (生化学工業社製) の水溶液 $100\mu\text{l}$ に、1M酢酸緩衝液 (pH6.0) を $20\mu\text{l}$ と、実施例1に記載のエンドAを $10\text{mU}$ 含む酵素溶液 $50\mu\text{l}$ を加え、 $37^\circ\text{C}$ にて10分間予備インキュベーションした。次いで $(\text{Man})_6(\text{GlcNAc})_2\text{-Asn}$  ( $13\text{mg/ml}$ ) を $100\mu\text{l}$ 添加し、 $37^\circ\text{C}$ で20分間反応させた後、 $100^\circ\text{C}$ にて3分間加熱処理し、反応を止めた。反応液を凍結乾燥後、実施例1に準じPA化した。HPLCを用いて精製し、PA化さ

れた転移生成物である $(\text{Man})_6(\text{GlcNAc})_3\text{-PA}$ を得た。次にこのPA化物の組成分析、NMR及びMS分析を行い、その糖鎖構造を確認した。

#### 【0024】実施例3 $(\text{GlcNAc})_3$ への糖鎖の転移反応

1、3Mの $(\text{GlcNAc})_3$  (生化学工業社製) の水溶液 $100\mu\text{l}$ に、1M酢酸緩衝液 (pH6.0) を $20\mu\text{l}$ と、実施例1に記載のエンドAを $10\text{mU}$ 含む酵素溶液 $50\mu\text{l}$ を加え、 $37^\circ\text{C}$ にて10分間予備インキュベーションした。次いで $(\text{Man})_6(\text{GlcNAc})_2\text{-Asn}$  ( $13\text{mg/ml}$ ) を $100\mu\text{l}$ 添加し、 $37^\circ\text{C}$ で20分間反応させた後、 $100^\circ\text{C}$ にて3分間加熱処理し、反応を止めた。反応液を凍結乾燥後、実施例1に準じPA化した。HPLCを用いて精製し、PA化された転移生成物である $(\text{Man})_6(\text{GlcNAc})_4\text{-PA}$ を得た。次にこのPA化物の組成分析、NMR及びMS分析を行い、その糖鎖構造を確認した。

#### 【0025】実施例4 $\text{Glc}$ への糖鎖の転移反応

1、3Mの $\text{Glc}$  (和光純薬社製) の水溶液 $100\mu\text{l}$ に、1M酢酸緩衝液 (pH6.0) を $20\mu\text{l}$ と、実施例1に記載のエンドAを $10\text{mU}$ 含む酵素溶液 $50\mu\text{l}$ を加え、 $37^\circ\text{C}$ にて10分間予備インキュベーションした。次いで $(\text{Man})_6(\text{GlcNAc})_2\text{-Asn}$  ( $13\text{mg/ml}$ ) を $100\mu\text{l}$ 添加し、 $37^\circ\text{C}$ で20分間反応させた後、 $100^\circ\text{C}$ にて3分間加熱処理し、反応を止めた。反応液を凍結乾燥後、実施例1に準じPA化した。HPLCを用いて精製し、PA化された転移生成物である $(\text{Man})_6(\text{GlcNAc})_1\text{-(Glc)}_1\text{-PA}$ を得た。次にこのPA化物の組成分析、NMR及びMS分析を行い、その糖鎖構造を確認した。

#### 【0026】実施例5 $\text{GalNAc}$ への糖鎖の転移反応

1、3Mの $(\text{Glc})_2$  (生化学工業社製) の水溶液 $100\mu\text{l}$ に、1M酢酸緩衝液 (pH6.0) を $20\mu\text{l}$ と、実施例1に記載のエンドAを $10\text{mU}$ 含む酵素溶液 $50\mu\text{l}$ を加え、 $37^\circ\text{C}$ にて10分間予備インキュベーションした。次いで $(\text{Man})_6(\text{GlcNAc})_2\text{-Asn}$  ( $13\text{mg/ml}$ ) を $100\mu\text{l}$ 添加し、 $37^\circ\text{C}$ で20分間反応させた後、 $100^\circ\text{C}$ にて3分間加熱処理し、反応を止めた。反応液を凍結乾燥後、実施例1に準じPA化した。HPLCを用いて精製し、PA化された転移生成物である $(\text{Man})_6(\text{GlcNAc})_1\text{-(Glc)}_2\text{-PA}$ を得た。次にこのPA化物の組成分析、NMR及びMS分析を行い、その糖鎖構造を確認した。

#### 【0027】実施例6 $\text{Man}$ への糖鎖の転移反応

1、3Mの $\text{Man}$  (和光純薬社製) の水溶液 $100\mu\text{l}$ に、1M酢酸緩衝液 (pH6.0) を $20\mu\text{l}$ と、実施例1に記載のエンドAを $10\text{mU}$ 含む酵素溶液 $50\mu\text{l}$ を加え、 $37^\circ\text{C}$ にて10分間予備インキュベーションした。次いで $(\text{Man})_6(\text{GlcNAc})_2\text{-Asn}$

(13mg/ml)を100 $\mu$ l添加し、37℃で20分間反応させた後、100℃にて3分間加熱処理し、反応を止めた。反応液を凍結乾燥後、実施例1に準じPA化した。HPLCを用いて精製し、PA化された転移生成物である(Man)<sub>6</sub>(GlcNAc)<sub>1</sub>(Man)<sub>1</sub>-PAを得た。次にこのPA化物の組成分析、NMR及びMS分析を行い、その糖鎖構造を確認した。

【0028】実施例7 GlcNAc-Asnへの糖鎖の転移反応

1. 3MのGlcNAc-Asn(バイオカーブケミカル社製)の水溶液100 $\mu$ lに、1M酢酸緩衝液(pH6.0)を20 $\mu$ lと、実施例1に記載のエンドAを10mU含む酵素溶液50 $\mu$ lを加え、37℃にて10分間予備インキュベーションした。次いで(Man)<sub>6</sub>(GlcNAc)<sub>2</sub>(13mg/ml)を100 $\mu$ l添加し、37℃で20分間反応させた後、100℃にて3分間加熱処理し、反応を止めた。反応液をダンシル化(以下Dns化と略記する)した後、HPLCを用いて精製し、Dns化された転移生成物である(Man)<sub>6</sub>(GlcNAc)<sub>2</sub>-Asn-Dnsを得た。次にこのDns化物の組成分析、NMR及びMS分析を行い、その糖鎖構造を確認した。

【0029】実施例8 PNP- $\alpha$ -Glcへの糖鎖の転移反応

1. 3MのPNP- $\alpha$ -Glc(生化学工業社製)の水溶液100 $\mu$ lに、1M酢酸緩衝液(pH6.0)を20 $\mu$ lと、実施例1に記載のエンドAを10mU含む酵素溶液50 $\mu$ lを加え、37℃にて10分間予備インキュベーションした。次いで(Man)<sub>6</sub>(GlcNAc)<sub>2</sub>-Asn(13mg/ml)を100 $\mu$ l添加し、37℃で20分間反応させた後、100℃にて3分間加熱処理し、反応を止めた。反応液を凍結乾燥後、HPLCを用いて精製し、転移生成物である(Man)<sub>6</sub>(GlcNAc)<sub>1</sub>(Glc)<sub>1</sub>-PNPを得た。次にこの生成物の組成分析、NMR及びMS分析を行い、その糖鎖構造を確認した。

【0030】実施例9 (Man)<sub>6</sub>(GlcNAc)<sub>1</sub>(Glc)<sub>1</sub>-PNPを用いたエンド $\beta$ -N-アセチルグルコサミナーゼのスクリーニング

96穴プレートに、基質として飽和の(Man)<sub>6</sub>(GlcNAc)<sub>1</sub>(Glc)<sub>1</sub>-PNPを含む100mM酢酸ナトリウム緩衝液50 $\mu$ lを入れ、土壤分離細菌の33株を各ウェルに接種し、8時間、37℃にてインキュベーション後、酵素由来の $\alpha$ -グルコシダーゼ(シグマ社製)5U/mlを20 $\mu$ l加え、3時間、37℃にてインキュベーションした後、0.1MのNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液を50 $\mu$ l添加した。供試した33菌株中、4菌株を接種したウェルの反応液が黄色を呈し、これらの菌株がエンド $\beta$ -N-アセチルグルコサミナーゼ活性を有

することが明確となった。上記方法を用いれば、該酵素を持った試料の場合、反応溶液が遊離したp-ニトロフェノールにより黄色に着色するため、容易に多数菌株のスクリーニングを行うことができる。

【0031】実施例9 Glc-OMeへの糖鎖の転移反応

1. 3MのGlc-OMe(生化学工業社製)の水溶液100 $\mu$ lに、1M酢酸緩衝液(pH6.0)を20 $\mu$ lと、実施例1に記載のエンドAを10mU含む酵素溶液50 $\mu$ lを加え、37℃にて10分間予備インキュベーションした。次いで(Man)<sub>6</sub>(GlcNAc)<sub>2</sub>-Asn(13mg/ml)を100 $\mu$ l添加し、37℃で20分間反応させた後、100℃にて3分間加熱処理し、反応を止めた。反応液を凍結乾燥後、HPLCを用いて精製し、転移生成物である(Man)<sub>6</sub>(GlcNAc)<sub>1</sub>(Glc)<sub>1</sub>-OMeを得た。次にこの生成物の組成分析、NMR及びMS分析を行い、その糖鎖構造を確認した。

【0032】実施例10 糖タンパク質への糖鎖の転移反応

糖タンパク質としてはリボヌクレアーゼB(シグマ社製)を用い、酵素はエンド $\beta$ -N-アセチルグルコサミナーゼ(生化学工業社製)を使用し、K. ヤマモト(K. Yamamoto)ら(J. Ferment. Technol., 第6巻, 第397~403頁(1986))の方法に従いGlcNAc-Asn-(タンパク質)の状態の糖タンパク質を調製した。次に該タンパク質を3mg含む10 $\mu$ lの1M酢酸緩衝液(pH6.0)に実施例1に記載のエンドAを3mU含む酵素液15 $\mu$ lを加え、10分間インキュベーションした後、(Man)<sub>6</sub>(GlcNAc)<sub>2</sub>-Asnを375 $\mu$ g加え、37℃で10分間反応を行った。次にSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、糖鎖が転移した(Man)<sub>6</sub>(GlcNAc)<sub>2</sub>-Asn-(タンパク質)の生成を確認し、SDS-ポリアクリルアミドゲルより抽出した生成物の糖組成分析によっても確認した。

【0033】

【発明の効果】本発明により、糖質又は複合糖質を直接アクセプターとする簡便な糖質又は複合糖質のリモデリック方法が提供される。該方法は目的の糖質又は複合糖質を速量良量容易に製造できる。また、微生物の生成も少なく、目的の糖質又は複合糖質の分離精製も容易であり、生体内で重要な働きを示す生理活性物質の糖鎖をリモデリングした物質の製造において特に有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明における転移反応時間と収率との関係の1例を示す図である。

【図1】

